

蛋白核小球藻发酵产油脂的研究

张薇 吴虹 宗敏华*

(华南理工大学 应用生物催化研究室 广州 510640)

摘要: 从 5 种不同来源的小球藻中筛选到 1 株油脂产量较高的蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa* No.2。研究了培养基组成及培养条件对其细胞生长和油脂积累的影响。结果表明, 最适培养基组成为(g/L): 葡萄糖 20, 甘氨酸 0.08, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, K_2HPO_4 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.004; 适宜的培养温度、初始pH、摇床转速和光照强度分别为 28℃、6.0、130 r/min和 650 Lux。在上述优化条件下培养 7 d, *Chlorella pyrenoidosa* No.2 的生物量和油脂含量分别由优化前的 3.73 g/L 和 40.15%提高到 6.56 g/L和 59.90%, 油脂产量提高了 162%。*Chlorella pyrenoidosa* No.2 能以木糖为碳源产油脂, 可望用于以木质纤维素等可再生生物质资源为原料生产油脂。气相色谱分析表明该油脂的脂肪酸组成与植物油相似, 不饱和脂肪酸含量达 71%左右, 可作为生产生物柴油的原料。

关键词: 蛋白核小球藻, 微生物油脂, 发酵

Study on Microbial Oil Production with *Chlorella pyrenoidosa*

ZHANG Wei WU Hong ZONG Min-Hua*

(Lab of Applied Biocatalysis, South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract: *Chlorella pyrenoidosa* No.2 was screened from five species of microalga *Chlorella* sp. for its higher lipid yield. Effects of medium components and culture conditions on cell growth as well as lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2 were investigated and the results showed that the optimum medium recipe was 20.0 g/L glucose, 0.08 g/L glycine, 1.0 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.004 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The optimum culture temperature, initial pH, shaking rate and light intensity were 28℃, 6.0, 130 r/min and 650 Lux, respectively. Biomass and lipid content increased from 3.73 g/L and 40.15% to 6.56 g/L and 59.90% when *Chlorella pyrenoidosa* No.2 was cultivated under the above optimal conditions for 7 days, with lipid yield raised by 162%. *Chlorella pyrenoidosa* No.2 could produce lipid with xylose as carbon source, and so is potential for lipid production from renewable materials such as lignocellulose. GC analysis demonstrated that the fatty acid composition of the lipid was similar to that of vegetable oil and its unsaturated fatty acid content reached around 71%, thus it is a promising material for biodiesel production.

Keywords: *Chlorella pyrenoidosa*, Microbial oil, Fermentation

生物柴油是一种以动植物油脂为原料制备、可替代化石柴油的绿色新能源。然而, 以动植物油脂

为原料导致生物柴油生产成本过高(原料成本占总生产成本的 75%左右), 并且大量使用植物油会引起

食用油价格上涨。以餐饮废弃油脂为原料虽然可有效降低生产成本,但由于原料来源有限,难以满足大规模生产生物柴油的需要,且产品的质量难以保证。因此寻找一种廉价且可持续大量供应的优质原料成为生物柴油产业化及广泛应用的关键。

微藻是一类单细胞藻类,其具有细胞增殖快,生产周期短、不受季节和土地的限制、所需的培养基来源丰富,以及所产的油脂成分与植物油类似等优点,因此,利用微藻开发油脂资源已日益受到人们的青睐,微藻被认为是一种极具潜力的生物柴油原料^[1]。目前用于发酵产油脂的藻类主要有*Chlorella protothecoides*, *Chlorella vulgaris*等^[2,3]。有研究表明,微藻在混养条件下较其自养时可积累更多的油脂^[4,5],因此,本论文探讨了不同来源的小球藻在混养条件下细胞生长和油脂积累的情况,从中筛选出油脂产量高的菌株。为进一步提高其产油能力,系统研究了培养基组成,包括碳源、氮源、碳氮比、二价金属离子(Mg^{2+} 和 Fe^{2+})以及培养条件,如温度、培养基初始pH值等对小球藻细胞生长和油脂积累的影响,测定和分析了该微生物油脂的脂肪酸组成。

1 材料与方法

1.1 藻种

小球藻 *Chlorella vulgaris* No.1 和 *Chlorella pyrenoidosa* No.1, 购自中国科学院武汉水生生物研究所。*Chlorella vulgaris* No.2、*Chlorella pyrenoidosa* No.2 和 *Chlorella pyrenoidosa* No.3, 由华南理工大学生物化工研究室提供。

1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基: 初始发酵培养基(g/L)^[4]: 葡萄糖 10, KNO_3 0.08, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003, vitamin B1 10^{-5} , A5 微量元素液 1 mL/L。

1.2.2 初始培养条件: 实验在装液量为 100 mL 的 250 mL 的三角烧瓶中进行。接种量为 10%, 培养温度为 25, 起始 pH 为 6.5, 光照强度为 1500 Lux, 摇床转速为 110 r/min, 发酵培养周期为 7 d。

1.3 生物量测定

干重法, 发酵液于 4000 r/min 下离心 10 min, 收集沉淀, 洗涤 1 次, 于 -80 冷冻干燥至恒重。

1.4 油脂抽提

用酸水解法抽提干菌体内的油脂^[6]。

1.5 脂肪酸组成的测定

参照文献方法制备微生物油脂的脂肪酸甲酯^[7]。

气相色谱工作条件: 采用 GC-2010 气相色谱仪, 配备 GC Solution 工作站, FID 检测器, 日本岛津公司; 毛细管色谱柱: DB-1(30.0 m \times 0.25 mm, 美国 Agilent 公司); 分析条件: 气化室温度 250, 检测室温度 280, 柱温 170, 以 10 /min 的速率升温至 190, 维持 1 min, 再以 0.8 /min 的速率升到 207, 维持 1 min; 载气为氮气, 流速为 28.5 mL/min; 分流比为 140:1(V/V); 进样量 1 μ L。

2 结果与讨论

2.1 高产油脂小球藻的筛选

表 1 描述了 5 种不同来源的小球藻细胞生长和油脂积累的情况。由该表可知, 与其他藻种相比, *C. pyrenoidosa* No.2 具有最高的生物量和油脂含量, 分别为 3.73 g/L 和 40.15%, 因此, 选择 *C. pyrenoidosa* No.2 为出发藻种进行进一步的研究。

表 1 不同小球藻细胞生长和油脂积累
Table 1 Cell growth and lipid accumulation of different *Chlorella* strains

藻种	生物量	油脂含量	油脂产量
Strain	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Lipid yield (g/L)
<i>C. vulgaris</i> No.1	3.47	12.03	0.42
<i>C. vulgaris</i> No.2	2.20	34.55	0.76
<i>C. pyrenoidosa</i> No.1	2.53	14.72	0.37
<i>C. pyrenoidosa</i> No.2	3.73	40.15	1.50
<i>C. pyrenoidosa</i> No.3	3.42	32.50	1.11

2.2 培养温度对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

从图 1 可见, 在 20 到 28 范围内, *C. pyrenoidosa* No.2 的生物量和油脂含量随着温度的升高而增加, 并且油脂含量的增速显著, 28 时, 生物量和油脂含量达到最大值, 分别为 3.76 g/L 和 42.85%。这可能是因为当温度较低时, 微藻生长和代谢缓慢, 所以生物量和油脂含量都较低, 随着温度升高, 藻体细胞生长代谢旺盛, 细胞内与油脂合成相关的酶被激活, 从而促进油脂的大量积累。而当温度高于 28 时, 生物量和油脂含量随着温度的继续升高而

减少。这是因为过高的温度会导致藻细胞提前进入衰老期^[8], 同时使细胞内与油脂合成相关的酶活力下降甚至部分失活^[9]。因此, 温度过高或过低均不利于微藻的生长及油脂的积累, 这与Opote报道的结果相一致^[9]。

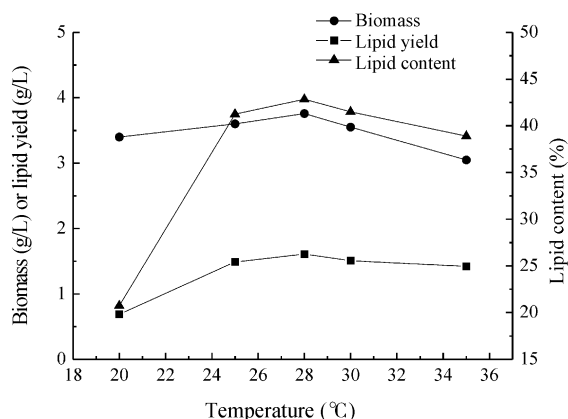


图 1 温度对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 1 Effect of temperature on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

2.3 初始 pH 对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

pH 不仅可通过引起细胞膜电荷变化和影响营养离子化程度来影响微生物对营养物的吸收, 而且还影响细胞内多种酶的活性。因此, 本文研究了 pH 对 *C. pyrenoidosa* No.2 细胞生长和油脂积累的影响(见图 2)。当 pH 从 4.0 升高为 6.0 时, *C. pyrenoidosa* No.2 的生物量和油脂含量随 pH 的升高而增加, 并在 pH 为 6.0 时, 生物量和油脂含量达到最大值, 分别为 3.88 g/L 和 43.47%, 此后, 随着 pH 的继续增大, *C. pyrenoidosa* No.2 的生物量和油脂含量明显下降。

2.4 摇床转速对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

由图 3 可知, 当摇床转速从 90 r/min 提高到 130 r/min 时, *C. pyrenoidosa* No.2 的生物量和油脂含量均明显增加, 当转速为 130 r/min 时, 生物量和油脂含量达到最大值。转速的继续增加导致菌体生物量急剧下降, 油脂含量也缓慢下降。实验中观察到藻细胞在转速较低时会集结成团, 因此过低的转速不利于细胞和营养物质的分散, 并且低转速时导致溶氧量不足, 不利于生长, 而随着摇床转速增加, 培养液中溶氧系数升高, 溶氧量增大, 小球藻可以

更好的进行生长和积累脂肪, 但转速过大则使剪切力增大, 导致细胞损伤, 在显微镜下观察细胞时可发现, 当摇床转速为 150 r/min 和 180 r/min 时, 有大量细胞碎片出现。并且转速过高时溶氧量过大, 会加快脂肪代谢, 使细胞油脂含量下降^[10]。

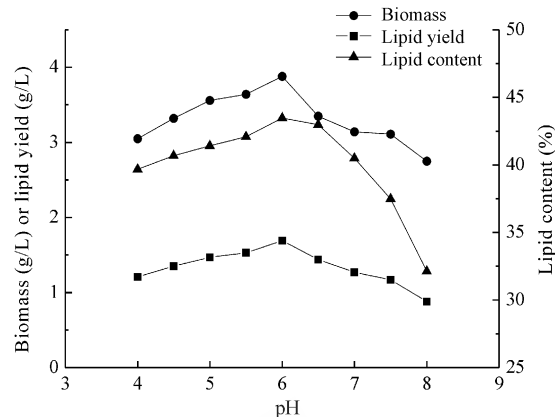


图 2 起始 pH 对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 2 Effect of initial pH on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

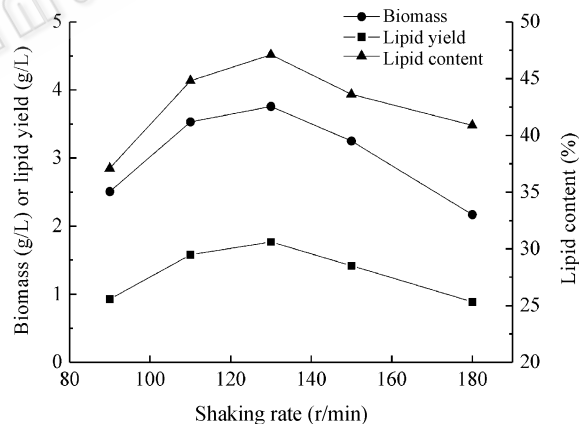


图 3 摇床转速对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 3 Effect of shaking rate on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

2.5 光照强度对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

从图 4 可见, 在黑暗条件下培养时, *C. pyrenoidosa* No.2 的生物量和油脂含量均很低, 仅为 3.07 g/L 和 35.74%, 随着光照强度的提高, 生物量和油脂含量逐渐增加, 并在光照强度为 650 Lux 时达到最大。之后, 随着光照强度的增大, 生物量呈明显下降趋势。当光照强度为 650 Lux~1000 Lux 时, 光

照强度对油脂含量的影响甚微, 超过 1000 Lux 后, 油脂含量随光照强度的继续升高而显著下降。可见低光照条件比高光照条件更有利于 *C. pyrenoidosa* No.2 细胞生长和油脂积累, 这与前人研究的结果一致^[11]。

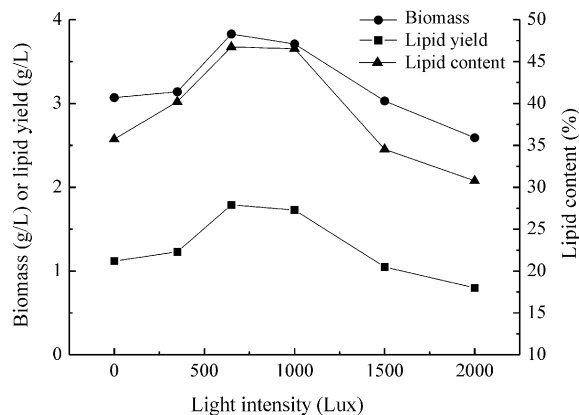


图 4 光照强度对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 4 Effect of light intensity on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

2.6 碳源对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

分别以葡萄糖、蔗糖、木糖、果糖和乳糖为原料, 考察碳源对 *C. pyrenoidosa* No.2 细胞生长和油脂积累的影响。由图 5 可知, 以葡萄糖为碳源时的生物量和油脂含量最高, 分别为 4.56 g/L 和 48.81%。*C. pyrenoidosa* No.2 在以果糖或 D-木糖为碳源的培养基中也能够较好地生长和积累油脂, 特别值得一提的是, *C. pyrenoidosa* No.2 以 D-木糖为碳源时, 油脂含量可达 43.61%, 可望用于以木质纤维素这一廉价可再生生物为原料生产油脂。

2.7 氮源对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

本文以尿素、硝酸铵、硫酸铵、蛋白胨、甘氨酸、硝酸钾为原料, 考察了氮源对 *C. pyrenoidosa* No.2 油脂生产的影响(图 6)。结果表明, 以甘氨酸为氮源时不但生物量最高(4.96 g/L), 且油脂含量最高(48.61%)。

2.8 碳氮比对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

当氮源消耗殆尽, 碳源充足的时候, 微藻能够继续吸收碳源, 将其转化成为油脂储存起来, 因此, C/N 比对微藻油脂合成的有显著影响^[12]。本文以葡萄糖为碳源, 固定氮源甘氨酸的浓度为 0.08 g/L, 研究了 C/N 比对 *C. pyrenoidosa* No.2 细胞生长和油脂积累的影响。从图 7 可见, 生物量随 C/N 的

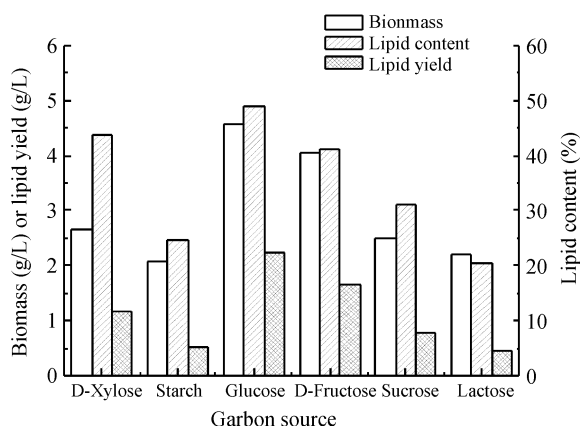


图 5 碳源对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 5 Effect of carbon source on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

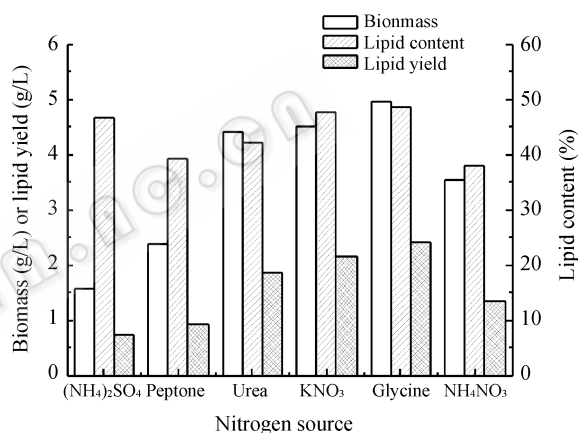


图 6 氮源对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 6 Effect of nitrogen source on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

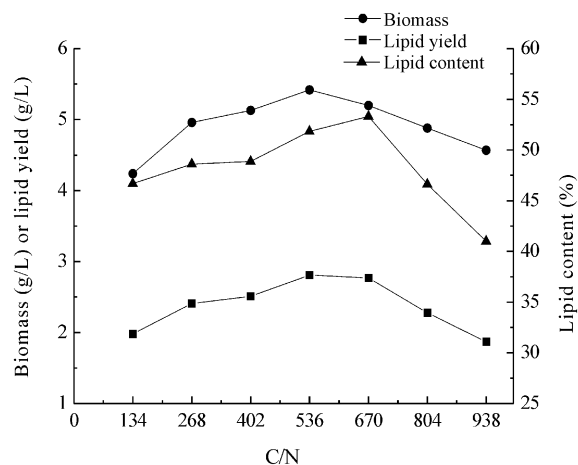


图 7 碳氮比对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 7 Effect of C/N on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

增大而逐渐增加,并在 C/N 为 536 时达到最大值 5.42 g/L,而后,随着 C/N 比的继续增大生物量缓慢下降。油脂含量在 C/N 比为 134 时仅为 46.70%,此后随着 C/N 比的升高明显增加,在 C/N 比为 670 时达到最大值 53.32%。继续升高 C/N 比导致油脂含量迅速下降。综合考虑,认为最佳碳氮比为 536。

2.9 二价金属离子对 *C. pyrenoidosa* No.2 产油脂的影响

已有的研究表明 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 等金属离子可以结合到油脂合成中的关键酶苹果酸酶上,通过影响酶的结构完整性从而影响油脂的合成^[13,14]。本文考察了 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 对蛋白核小球藻细胞生长和油脂积累的影响。从图 8 可知,当 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的浓度从 0 g/L 增大至 0.4 g/L 时,*C. pyrenoidosa* No.2 的油脂含量显著提高,并且生物量也逐渐增大,油脂产量在 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的浓度为 0.4 g/L 时达到最大值 3.53 g/L,此后,随着 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度的继续升高,生物量略有下降,而油脂含量明显降低。结果表明适量 Mg^{2+} 的存在有利于油脂的合成,而过多的 Mg^{2+} 会产生副作用,这与前人的报道相一致^[13,14]。

由图 9 可知, Fe^{2+} 对小球藻生物量和油脂含量的影响规律与 Mg^{2+} 相似。当 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 浓度为 0.004 g/L 时,*C. pyrenoidosa* No.2 的油脂产量达到最大值 3.93 g/L,此时,生物量和油脂含量分别为 6.56 g/L 和 59.90%。

经过上述优化,适宜的培养基组成为(g/L):葡萄糖 20,甘氨酸 0.08, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4, K_2HPO_4 1.0,

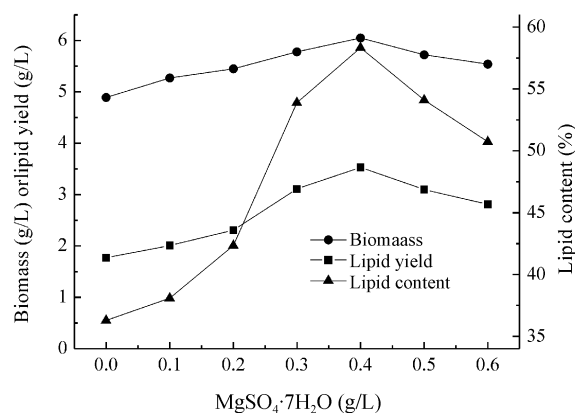


图 8 Mg^{2+} 浓度对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 8 Effect of Mg^{2+} on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

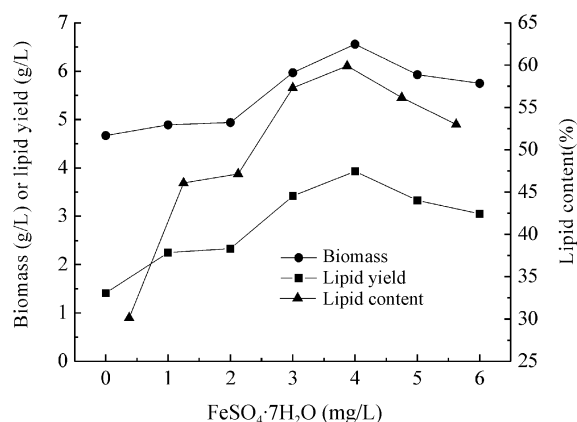


图 9 Fe^{2+} 浓度对蛋白核小球藻 No.2 细胞生长和油脂积累的影响

Fig. 9 Effect of Fe^{2+} on cell growth and lipid accumulation of *C. pyrenoidosa* No.2

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.004, vitamin B1 10^{-5} , A5 微量元素液 1 mL/L。最适的培养温度、初始 pH、摇床转速和光照强度分别为 28、6.0、130 r/min 和 650 Lux。*C. pyrenoidosa* No.2 在优化条件下摇瓶培养 7 d 后的生物量和油脂含量分别由优化前的 3.73 g/L 和 40.15% 提高到 6.56 g/L 和 59.90%, 明显高于前人报道的最佳对应值(*C. protothecoides* 摇瓶培养时生物量和油脂含量分别为 3.92 g/L 和 55.3%)^[3]。并且 *C. pyrenoidosa* No.2 能以木糖为碳源产油脂, 具有较大的应用潜力, 可望用于以木质纤维素等可再生生物质资源为原料生产油脂, 为生物柴油生产提供大量的替代原料。

2.10 油脂脂肪酸成分的分析

气相色谱分析结果表明, *C. pyrenoidosa* No.2 所产油脂的主要脂肪酸组成为棕榈酸、油酸、亚油酸、亚麻酸和硬脂酸, 其含量分别: 21.50%, 30.62%, 19.82%, 19.13% 和 7.81%。其中不饱和脂肪酸含量达到 71% 左右, 其组成与植物油脂相似, 因此, 可作为制备生物柴油的原料。经检测该油脂的酸值较高 (5.8 mg KOH/g), 故在采用碱法进行转酯反应前需对原料油脂进行脱酸处理。利用有机溶剂脱酸法^[15], 以甲醇为萃取剂, 甲醇与油脂粗提物的比例为 1:1 (V/W), 室温下搅拌 20 min 后静置分层, 取油层, 重复上述操作 3 次, 使该油脂的酸值降到约 1 mg KOH/g。然后取脱酸后的油脂 2 g, 加入醇油摩尔比为 6:1 的甲醇, 油重 1% 的 KOH, 于 65℃ 下反应 1 h, 甲酯产率可达 90%。

参 考 文 献

- [1] Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*, 2007, **25**(3): 294–306.
- [2] Scragg AH, Illman AM, Carden A, *et al.* Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass Bioenerg*, 2002, **23**(1): 67–73.
- [3] Xu H, Miao XL, Wu QY. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol*, 2006, **126**(4): 499–507.
- [4] 吴庆余, 殷 实, 盛国英, 等. 自养与异养小球藻热模拟产气的对比研究. 自养科学进展-国家重点实验室通讯, 1992, **2**(5): 435–440.
- [5] 桂 林, 史贤明, 李 琳, 等. 蛋白核小球藻不同培养方式的比较. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2005, **26**(5): 52–55.
- [6] 曹 健, 汪晨辉, 曾 实, 等. 卷枝毛霉 *Mucor circine-lloides* 3.2208 油脂几种提取方法的比较. 中国油脂, 2004, **29**(4): 38–40.
- [7] GB/T 17376-1998. 动植物油脂脂肪酸甲酯制备.
- [8] 王菊芳, 梁世中, 陈 峰. 环境条件对隐甲藻生长及DHA产量的影响. 海洋科学, 2002, **26**(2): 62–65.
- [9] Opute, FI. Studies on fat accumulation in *Nitzschia palea*. *Ann Bot NS*, 1974, **38**(4): 889–902.
- [10] 石 娟, 潘克厚. 不同培养条件对微藻总脂含量和脂肪酸组成的影响. 海洋水产研究, 2004, **25**(6): 79–85.
- [11] Meseck SL, Alix JH, Wikfors GH. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*, 2005, **246**(1–4): 393–404.
- [12] 张大兵, 吴庆余. 小球藻细胞的异养转化. 植物生理学通讯, 1996, **32**(2): 140–141.
- [13] Jerneic K, Legisa M. The influence of metal ions on malic enzyme activity and lipid synthesis in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **217**(2): 185–190.
- [14] Zhang YJ, Wang ZL, Sprou D, *et al.* In silico design and synthesis of piperazine-1-pyrrolidine-2, 5-dione scaffold-based novel malic enzyme inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16**(3): 525–528.
- [15] 肖志红, 刘汝宽, 李昌珠, 等. 光皮树油溶剂萃取脱酸工艺研究. 粮油加工, 2006, **11**: 45–47.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 ~5 不可写成 3~5 ; 3%~6%不可写成 3~6%等。

文中的数值和单位之间应加一个空格, 除了%和 。